

各種固形癌から分離した腫瘍内浸潤リンパ球(TIL)のrIL-2による活性化とその抗腫瘍活性担当細胞の解析

著者	石井 誠一
学位授与機関	Tohoku University
URL	http://hdl.handle.net/10097/54617

博士論文

各種固形癌から分離した腫瘍内浸潤リンパ球
(TIL)のrIL-2による活性化とその抗腫瘍活性
担当細胞の解析

東北大学医学部附属病院第1外科

石井誠一

①
各種固形癌から分離した腫瘍内浸潤リンパ球
(TIL)のrIL-2による活性化とその抗腫瘍活性
担当細胞の解析

東北大学医学部附属病院第1外科

石井誠一（指導：松野正紀教授）

内 容 要 旨

〔 目 的 〕 各 種 固 形 癌 組 織 内 に 浸 潤 し た リ ン パ
球 (T I L) を 分 離 し そ の 性 状 を 解 析 す る と と も
5 に 、 自 己 の 癌 細 胞 に 対 し 抗 腫 瘍 活 性 を 有 す る
活 性 化 T I L の 誘 導 を 試 み 、 そ の 抗 腫 瘍 能 担 当
サ ブ セ ッ ト を 検 索 す る こ と を 目 的 と し た 。

〔 方 法 〕 各 種 固 形 癌 46 例 (腎 癌 24 , 消 化 器 癌 15
10 , 乳 癌 5 , 肺 癌 1 , 悪 性 黒 色 腫 1) か ら 酵 素 処 理 に
よ り 腫 瘍 浸 潤 リ ン パ 球 (T I L) を 分 離 し 、 r I L - 2
1 , 0 0 0 U / m l の 存 在 下 に 培 養 し て 活 性 化 T I L を 誘
導 し た 。 同 時 に 新 鮮 分 離 癌 細 胞 を 凍 結 保 存 し
た 。 得 ら れ た 活 性 化 T I L の 自 己 お よ び 非 自 己 の
新 鮮 分 離 癌 細 胞 (以 下 自 己 癌 , 非 自 己 癌) に 対
15 す る 抗 腫 瘍 活 性 と リ ン パ 球 サ ブ セ ッ ト の 変 動
を 経 時 的 に 測 定 し た 。 抗 腫 瘍 活 性 は 4 時 間 の
 ^{51}Cr release assay で 、 リ ン パ 球 サ ブ セ ッ ト
は flow cytometry 法 で 測 定 し た 。 ま た 活 性 化 T
I L を 抗 体 + 補 体 で 処 理 し 抗 腫 瘍 活 性 を 有 す る
サ ブ セ ッ ト を 解 析 し た 。

[結 果] 腎 癌 24 例 の う ち 21 例 で 、 そ の 他 の 癌
22 例 の う ち 20 例 で 活 性 化 TIL を 誘 導 し 得 た 。 活
性 化 TIL の 自 己 癌 に 対 す る % 細 胞 障 害 活 性 (以
下 % 活 性) は 腎 癌 お よ び そ の 他 の 癌 で そ れ ぞ
5 れ $23.8 \pm 4.3\%$ ($n=16$) , $10.4 \pm 2.6\%$ ($n=15$) で あ
り 腎 癌 由 来 の TIL で 有 意 に 高 値 で あ っ た 。 非
自 己 癌 に 対 す る % 活 性 お よ び NK 活 性 、 LAK 活 性
も 腎 癌 由 来 の 活 性 化 TIL で そ の 他 の 癌 由 来 の
活 性 化 TIL より 有 意 に 高 値 で あ っ た 。 ほ と ん ど
10 の 活 性 化 TIL は 非 特 異 的 細 胞 障 害 活 性 を 示 し 、
自 己 癌 に 対 す る 標 的 細 胞 特 異 性 は 誘 導 さ れ な
か っ た 。 リ ン パ 球 表 面 マ ー カ ー の 検 索 で は 分
離 時 の TIL は $CD3^+$ の T 細 胞 が 主 体 で あ り 、 $CD16^+$
の NK 細 胞 は 少 数 で あ っ た 。 培 養 後 の phenotype
15 は 由 来 臓 器 に よ り 特 徴 的 に 変 動 し た が 、 TIL の
活 性 の 強 さ は $CD3$ の 陽 性 率 、 $CD16$ の 陽 性 率 と は
相 関 せ ず Leu19 の 陽 性 率 と 相 関 を 示 し た 。 活 性
化 TIL を 抗 体 + 補 体 で 処 理 し effector 細 胞 を 解
析 し た 結 果 で も 、 TIL の 活 性 は Leu19 抗 体 + 補 体
処 理 で 強 く 抑 制 さ れ 抗 $CD3$ 抗 体 ・ 抗 $CD16$ 抗 体 +

補体処理では抑制されず、細胞障害活性はCD
3⁻・CD16⁻・Leu19⁺のNK細胞サブセットに依存
することが示された。

5 索引用語：腫瘍内浸潤リンパ球，細胞障害活
性，リンパ球サブセット，flow cytometry
法，effector細胞

はじめに

近年、進行癌に対する新しい治療法として
LAK (lymphokine activated killer) 養子免疫
療法が注目され、すでに多くの臨床報告がな
5 されている¹⁾。しかし、現在までのところその
有効例は悪性黒色腫などの一部の腫瘍に限ら
れており LAK 療法は一般の悪性腫瘍に対する
治療法として確立されるには到っていない。

10 一方、従来、間質に高度のリンパ球浸潤を
ともなう悪性腫瘍の予後は良好であることが
知られており、腫瘍内浸潤リンパ球 (tumor
infiltrating lymphocyte; TIL) は担癌
生体の免疫学的腫瘍抵抗性を表すものと考え
15 られて来た^{2) 3)}。最近になって、腫瘍組織よ
り分離した TIL を recombinant interleukin-
2 (rIL-2) の存在下に培養することにより、
強い抗腫瘍活性を持ちしかも自己癌細胞を特
異的に障害する活性化 TIL を誘導し得ること
が動物実験で示され^{4) 5)}、活性化 TIL の移入

療 法 が L A K 療 法 よ り 優 れ た 治 療 法 と な り 得 る
も の と し て 注 目 を 集 め て い る 。 人 の 悪 性 腫 瘍
で も 活 性 化 T I L の 誘 導 が 試 み ら れ 、 悪 性 黒 色
腫 で は i n v i t r o で 自 己 の 新 鮮 分 離 癌 細 胞 を 特
5 異 的 に 障 害 す る 活 性 化 T I L が 誘 導 さ れ る こ と
が 報 告 さ れ て い る ^{6) - 8)}。 腎 癌 な ど で も 強 い
抗 腫 瘍 能 を 有 す る 活 性 化 T I L を 誘 導 し 得 る こ
と が 報 告 さ れ て い る が ^{9) - 16)}、 悪 性 黒 色 腫 以
外 で は T I L の 細 胞 障 害 活 性 に 自 己 癌 細 胞 特 異
10 性 を 認 め た と す る 報 告 は 少 な い 。

今 回 、 T I L の 性 状 を 明 ら か に す る こ と を 目
的 と し て 各 種 固 形 癌 46 例 よ り T I L を 分 離 し 、
r I L - 2 の 存 在 下 に 培 養 し て 活 性 化 T I L の 誘 導 を
試 み た 。 得 ら れ た 活 性 化 T I L の 自 己 お よ び 非
15 自 己 の 新 鮮 分 離 癌 細 胞 に 対 す る 細 胞 障 害 活 性
を 測 定 し 、 自 己 癌 細 胞 に 対 す る 特 異 的 細 胞 障
害 活 性 を 誘 導 し 得 る か 否 か に つ い て 検 討 を 加
え た 。 ま た 、 f l o w c y t o m e t r y 法 に よ り 培 養 前
後 の T I L の p h e n o t y p e の 変 動 を 検 討 し 、 さ ら に
抗 体 + 補 体 処 理 に よ り 活 性 化 T I L の 抗 腫 瘍 活

性を担当する effector 細胞を解析して、各種固形癌から分離した TIL の免疫学的性状を明らかにしたので報告する。

対象

当科および関連施設で 1988 年 11 月より 1990 年 2 月までに外科的に切除された腎癌 24 例、消化器癌 15 例（原発性肝癌 6 例、直腸癌 6 例、食道癌 1 例、肝癌副腎転移巣 1 例、大腸癌肝転移巣 1 例）、乳癌 5 例、肺癌副腎転移巣 1 例、悪性黒色腫 1 例の固形癌 46 例・46 病巣（原発巣 43 例・転移巣 3 例）を対象とした（表 1）。

いずれの症例も術前に化学療法、放射線療法、免疫賦活剤の投与などは受けておらず、摘出標本の病理組織学的検索で悪性腫瘍であることが確認されたものである。

方法

1. 細胞浮遊液の作成：手術室にて切除直後に癌組織を無菌的に採取した。直腸癌および食道癌では細菌感染を防ぐために粘膜面の汚染を清拭し、99.9%無菌エタノールで約30秒間洗浄滅菌した。採取組織より非癌部、壊死部を除去した後、癌組織を1~2mm³に細切し、collagenase type IV, hyaluronidase type V, deoxyribonuclease type I (いずれもSigma社製)を含むAIM VTM培養液(以下AIM V; GIBCO社製)40mlまたは80mlに浮遊した。室温で60~120分間攪拌して得られた細胞浮遊液を滅菌ガーゼで濾過しdebrisを除去して遠沈し、さらにPBSで2回洗浄した後pelletをAIM Vに浮遊した。細胞浮遊液に含まれるリンパ球および癌細胞の生細胞数は0.2% trypan blueによる色素排泄試験で算定した。回収されたTILのrIL-2添加培養とflow cytometry法による新鮮分離TILのリンパ球サブセットの解析を行ない、同時に新鮮分離癌細胞を90% FCS + 10% DMSO液に浮遊して凍結し-180℃

で保存した。なお密度勾配遠心法によるリンパ球と癌細胞の分離は回収細胞数が減少するため通常行なわず、新鮮分離 TIL と新鮮分離癌細胞は多くの場合同一の細胞浮遊液を用いた。

2. 活性化 TIL の誘導 (図 1) : 癌細胞を含む細胞浮遊液をリンパ球数が $1.0 \times 10^6 / \text{ml}$ となるように AIMV に再浮遊し、rIL-2 (塩野義製薬より供与) $1,000 \text{ U} / \text{ml}$ を添加して 5% CO_2 を含む 37°C の incubator 内で静置培養した。培養には 24 穴の culture plate を用い、3~4 日毎に培養液の上清半量を rIL-2 $1,000 \text{ U} / \text{ml}$ を含む AIMV と交換した。リンパ球数は培養液交換のつど算定し $5.0 \times 10^5 \sim 4.0 \times 10^6 / \text{ml}$ を保つように希釈を行ない、viability が低下し維持不能となるまで培養を継続した。

3. 細胞障害活性の測定 : 活性化 TIL の細胞障害活性は 4 時間の Chromium-51 release assay で測定し、培養開始後 7~10 日目に第 1 回の細胞障害活性測定を行ないその後可能な

限り 7 日 毎 に 測 定 を 繰 り 返 し た 。 標 的 細 胞 と
し て は 凍 結 保 存 し た 新 鮮 分 離 自 己 癌 細 胞 お よ
び 新 鮮 分 離 非 自 己 癌 細 胞 を 細 胞 障 害 試 験 の 直
前 に 解 凍 し て 用 い 、 同 時 に 継 代 培 養 し た K 5 6 2
5 お よ び W I S H 細 胞 ¹⁷⁾ を そ れ ぞ れ N K 活 性 ・ L A K
活 性 測 定 の 標 的 細 胞 と し て 用 い た 。 非 自 己 の
癌 細 胞 は 同 一 臓 器 の 癌 腫 で 組 織 学 的 に も 一 致
す る も の を 用 い た 。 標 的 細 胞 は $100 \mu\text{Ci}$ の Na_2
 $^{51}\text{CrO}_4$ (N E N 社 製) で 6 0 分 間 ラ ベ ル し 、 P B S に
10 て 2 回 洗 浄 し た の ち R P M I 1 6 4 0 に 浮 遊 し $2 \sim 5 \times$
 $10^4 / \text{ml}$ と な る よ う に 調 整 し た 。 ラ ベ ル さ れ た
標 的 細 胞 浮 遊 液 を $100 \mu\text{l}$ づ つ 9 6 穴 丸 底 マ イ ク
ロ テ ス ト プ レ ー ト に 分 注 し 、 E f f e c t o r / T a r g e t
r a t i o = 2 0 , 1 0 , 5 , 2 . 5 の 4 段 階 と な る よ う
15 に 調 整 し た T I L 浮 遊 液 を $100 \mu\text{l}$ づ つ 加 え 37°C
で 4 時 間 培 養 し た 後 、 上 清 $100 \mu\text{l}$ を 回 収 し て
そ の 放 射 活 性 を ガ ン マ シ ン チ カ ウ ン タ ー
(A l o k a 社 製 A R C - 5 0 0) で 測 定 し た 。 測 定 は す べ
て t r i p l i c a t e で 行 な い 、 s p o n t a n e o u s r e l e a s e
, m a x i m u m r e l e a s e の 値 は そ れ ぞ れ 標 的 細 胞

浮遊液に培養液または1規定のNaOHを加えその上清100 μ lの放射活性を測定して得た。

% specific lysisは次式で算出した。

% specific lysis =

5
$$\frac{\text{Experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{Maximum release} - \text{spontaneous release}}$$

$$\times 100$$

4. リンパ球表面マーカーの解析: TILのリンパ球表面マーカーをflow cytometry法で
10 解析した。モノクローナル抗体は、抗Leu-2a(抗CD8), 抗Leu-3a(抗CD4), 抗Leu-4(抗CD3), 抗Leu-11a(抗CD16), 抗Leu-19(抗CD56)抗体, 抗HLA-DR抗体および抗IL-2リセプター(抗CD
25)抗体(いずれもBECTON DICKINSON社製)を用いtwo colourで解析した。
15

5. 活性化TILの抗体+補体処理: 細胞障害活性を担当するeffector細胞を解析するため、活性化TILを抗体と補体で処理して ^{51}Cr release assayを施行した。抗体はOKT3(抗CD3), OKT4(抗CD4), OKT8(抗CD8)抗体(いずれ

も Ortho-mune 社製)および抗 Leu-11b(抗 CD16)抗体(BECTON DICKINSON 社製), NKH-1A(抗 CD56)抗体(COULTER CLONE 社製)を用い、補体はウサギ補体(CEDARLANE 社製)を用いた。TILを4℃で45分間抗体処理したのち補体で37℃30分間処理し、対照は補体処理のみとして細胞障害活性を⁵¹Cr release assayで測定した。

結果

1. TIL の分離および培養: rIL-2 1,000 U/ml を添加した AIMV を用いて TIL の 7 日以上
の培養は、46 例のうち 41 例(89.1%)で可能であった。由来臓器別では、腎癌で 24 例中 21 例(87.5%)、その他の癌 22 例では肝癌の 2 例を除く 20 例(90.9%)に 7 日以上
の培養が可能であった。培養不能であった 5 例では培養開始後数日以内に TIL は全く増殖せずに死滅した。
以下、7 日以上
の培養が可能であった 41 例について解析を行なった(表 2)。分離回収さ

れたリンパ球数と癌細胞数はいずれも腎癌、肝癌で多く、リンパ球数と癌細胞数の比も腎癌、肝癌で2.0前後とその他の癌に比較して大きかった。TILの培養日数をみるとほぼ2/3の症例で30日以上 of 長期培養が可能であった。臓器別では腎癌由来のTILで平均 29.6 ± 3.0 日(12~66日)とその他の癌由来のTILと比較してやや培養可能日数が短かったが有意の差はなかった。TILの増殖 pattern について典型例を図2に示した。長期培養可能例では図2aのように30日を越える指数関数的な増殖を示したが、約1/3の症例では図2bのように培養10日を過ぎると増殖能が低下し20日後で培養維持不能となった。培養開始時のリンパ球数に対するTILの増殖率をみると、1倍前後から 1.2×10^6 倍までと症例により大きく異なった。由来臓器別に比較すると、TILが100倍以上に増殖した症例は腎癌では21例中3例(14.3%)のみであったのに対し、その他の癌では20例中11例(55.0%)であり、腎癌

由来の TIL では細胞増殖能が低い傾向であった。なお trypan blue による色素排泄試験では培養開始時に混在した癌細胞はほとんどの症例で培養 7 日以内に死滅することが確認された。

2. 活性化 TIL の細胞障害活性：活性化 TIL の凍結保存した新鮮分離自己癌細胞および新鮮分離非自己癌細胞（以下自己癌および非自己癌）に対する細胞障害活性と NK 活性・LAK 活性を 4 時間の ^{51}Cr release assay で測定した（表 3）。活性化 TIL の細胞障害活性を由来臓器別に検討すると、自己癌に対する細胞障害活性は腎癌で平均 $25.8 \pm 4.30\%$ （ $-0.2 \sim 64.4\%$ ， $n = 16$ ）であったのに対しその他の癌全体では $10.4 \pm 2.62\%$ （ $-0.1 \sim 38.1\%$ ， $n = 15$ ）であり、腎癌由来の活性化 TIL で有意に高値を示した（ $P < 0.005$ ）。非自己癌に対する細胞障害活性も腎癌 $19.9 \pm 3.85\%$ （ $1.5 \sim 55.1\%$ ， $n = 18$ ）、その他の癌 $4.55 \pm 1.81\%$ （ $-2.7 \sim 13.7\%$ ， $n = 8$ ）と腎癌で有意に高値であった（ $P <$

0.05)。またNK活性、LAK活性も腎癌由来の活性化TILで有意に高値であった。

つぎに、自己癌に対する細胞障害活性と非自己癌に対する細胞障害活性を同時に測定し得た22例（腎癌16例，その他の癌6例）で活性化TILの標的細胞特異性の有無を検討した（表4）。図3aのように活性化TILが自己癌に特異性の高い細胞障害活性を示した症例は数例のみであり、ほとんどの症例は図3b,cのような非特異的活性を示した。22例について活性化TILの自己癌および非自己癌に対する細胞障害活性の平均値を比較検討すると、腎癌、その他の癌由来の活性化TILはいずれも自己癌、非自己癌に対する細胞障害活性に統計学的有意差を示さず、活性化TILが自己癌を特異的に障害するという結果は得られなかった。さらに活性化TILの自己癌に対する細胞障害活性と非自己癌に対する細胞障害活性の相関関係を検討すると両者間には正の相関が認められた（図4）。同様に活性化TILの

自己癌に対する細胞障害活性はNK活性およびLAK活性とも正の相関を示した。また、活性化TILの細胞障害活性の経時的変化を検討すると、ほとんどの症例が図5a, b, cのように培養開始後10～20日で最も高い細胞活性を示し、それ以降は低下する傾向であり、培養を長期間維持することにより自己癌細胞特異性が誘導されることはなかった。

3. リンパ球表面マーカーの解析(表5):

リンパ球サブセットの検討では、新鮮分離時のTILは由来臓器によらずLeu4(CD3)陽性のT細胞が主体であり、Leu11(CD16)陽性のNK細胞はほとんどの症例で10%以下であった。

CD4/CD8比は症例によって異なり由来臓器による一定の傾向は認められなかった。rIL-2添加培養により誘導された活性化TILのリンパ球表面マーカーの変動をみると、腎癌由来のTILでは培養にともないCD3の陽性率が低下する傾向を認め特にCD4の陽性率は有意の低下を示した($P < 0.005$)。また、Leu11の陽

性率が低下する傾向であったのに対し Leu19
の陽性率は有意に上昇した ($P < 0.005$)。一方、
直腸癌由来の TIL では培養により CD3 の陽
性率が上昇し、特に CD4⁺ のサブセットが顕著
5 に増加した ($P < 0.005$)。その他の臓器由来の
TIL では T 細胞マーカー・NKマーカーに有意
の変動は認められなかった。IL-2リセプター
の陽性率および HLA-DR 抗原の陽性率は由来臓
器の如何によらず rIL-2 添加培養により上昇
10 する傾向であった。

つぎに、活性化 TIL のリンパ球表面マーカー
の陽性率と細胞障害活性の相関について検討
を加えた。活性化 TIL の NK 活性、LAK 活性と
リンパ球表面マーカー陽性率との相関を求め
15 ると、NK 活性、LAK 活性はいずれも Leu19 の陽
性率と正の相関を示した (図 6 a, b)。しかし
、CD3 および Leu11 (CD16) の陽性率とは相関
を認めなかった。自己癌に対する細胞障害活
性とリンパ球表面マーカーの陽性率が同時に
測定された 25 例について両者の相関を求める

と、活性化 TIL の自己癌に対する細胞障害活性は CD4 の陽性率と弱い負の相関を示した ($r = 0.49$, $P < 0.05$, 図 7) が、その他のマーカーの陽性率とは有意の相関を示さなかった。

4. 抗体 + 補体処理: rIL-2 添加培養により誘導された活性化 TIL の抗腫瘍活性を担当する effector 細胞を解析するため、活性化 TIL を抗体と補体で処理したのち ^{51}Cr release assay を施行した (図 8, 表 6)。腎癌由来の活性化 TIL の 1 例であるが、細胞障害活性は標的細胞の如何に関わらず抗 Leu19 (抗 CD56) 抗体 + 補体処理により明らかに低下したが、OKT3 (抗 CD3) 抗体, OKT4 (抗 CD4) 抗体, OKT8 (抗 CD8) 抗体 + 補体処理では変化を認めず、抗 Leu11 (抗 CD16) 抗体 + 補体処理でもわずかな低下を示すのみであった。したがって、 $\text{CD3}^+ \cdot \text{Leu11}^- (\text{CD16}^-) \cdot \text{Leu19}^+ (\text{CD56}^+)$ 細胞が抗腫瘍活性を担当する主要なサブセットであると考えられた。同時に行なったリンパ球表面マ

カーの解析では $\text{Leu}4^{-}(\text{CD}3^{-}) \cdot \text{Leu}19^{+}(\text{CD}56^{+})$ のサブセットおよび $\text{Leu}11^{-}(\text{CD}16^{-}) \cdot \text{Leu}19^{+}(\text{CD}56^{+})$ のサブセットがそれぞれ 64.5%, 55.7% を占めており(表7)、上記 effector 細胞 (CD3⁻・CD16⁻・Leu19⁺) の存在を支持する結果であった。さらに腎癌の数例と大腸癌肝転移巣の1例で抗体+補体処理により活性化TILの effector 細胞の解析を行なったが、抗CD56抗体+補体処理により全例で活性の低下が認められたのに対し抗CD3抗体+補体処理では細胞障害活性の低下を認められなかった。抗CD16抗体+補体処理では一部の症例で活性の若干の低下を認めた。したがって、rIL-2 添加培養により誘導された活性化TILの抗腫瘍活性は CD3⁻・CD16⁻・Leu19⁺ のサブセットに最も強く、一部 CD3⁻・CD16⁺ のサブセットが関与し、CD3⁺ のT細胞サブセットは抗腫瘍活性を担当しないものと考えられた。

考 察

古くから、間質に高度のリンパ球浸潤を伴う悪性腫瘍の予後は良好であることが知られており、腫瘍内浸潤リンパ球（TIL）は担癌生体の免疫学的腫瘍抵抗性を表すものとして注目されてきた^{2) 3)}。しかし、TILを腫瘍組織から分離することは困難であり、分離し得たTILも自己癌細胞に対してin vitroで細胞障害活性を示さず、また自己癌細胞刺激によるTILの増殖反応も認められなかったため、その機能や免疫学的性状に関しては十分な解析がなされていなかった^{1 8)}。ところが最近になってRosenbergら^{4) 5)}は、マウス腫瘍組織より分離したTILをrIL-2の存在下に培養することにより、いわゆるLAK細胞より50～100倍の強度の微小転移形成阻止効果を持ちしかも自己癌細胞を特異的に障害する活性化TILが誘導されることを報告し、活性化TILの移入療法がLAK療法より優れた治療法になり得る

ものとして注目を集めた。その後、多くの施設で人の悪性腫瘍からの活性化TILの誘導が試みられ^{6) - 15)}、すでに臨床応用の報告も散見されている^{19) - 23)}。しかし、TILの機能や免疫学的性状に関する見解は一定しておらず、その本態は未だ十分に解明されているとはいい難い。

今回の検討では、rIL-2の添加培養により各種固形癌由来の活性化TILを誘導することが可能であった。活性化TILは新鮮分離自己癌細胞に対して細胞障害活性を示したが新鮮分離非自己癌細胞をも障害し、同時に高いNK活性とLAK活性を表した。特に腎癌由来の活性化TILはその他の臓器の癌由来の活性化TILに比較していずれの標的細胞に対しても有意に高い細胞障害活性を示した。しかし、由来臓器の如何に関わらず活性化TILの細胞障害活性は非特異的であり、自己癌細胞に対する標的細胞特異性は誘導されなかった。また、分離直後のTILはCD3⁺のT細胞が主体であっ

たのに対して、rIL-2の存在下に培養された
TILのphenotypeは由来臓器により特徴的変
動を示し、その細胞障害活性にはLeu19の陽
性率と正の相関が認められた。さらに、TIL
5を抗体+補体で処理してeffector細胞の解析
を行なった結果では、活性化TILの抗腫瘍活
性はCD3⁻・CD16⁻・Leu19⁺のNK細胞由来のサブ
セットに最も強いことが示され、CD3⁺のT細胞
サブセットは抗腫瘍活性を担当しないもの
10と考えられた。

分離直後のTILのリンパ球サブセットがT
細胞主体であることは諸家の報告とも一致す
る⁶⁾⁻¹⁶⁾。しかし、TILをrIL-2の存在下に
培養することにより自己癌細胞を特異的に認
15識し障害するcytotoxic T lymphocyte(CTL)
を誘導し得るか否かについては様々な検討が
なされているが、未だ明確な解答は得られて
いない。堀ら²⁴⁾はマウス自然発生乳癌より
分離したTILが腫瘍を特異的に障害すること
を示し、腫瘍抗原により感作を受けたT細胞

の存在することを示唆している。また Spiess
ら⁵⁾は複数のマウス肉腫より TIL を分離し、
免疫原性の高い肉腫より分離した TIL では極
めて強力に微小転移形成を阻止し、しかも特
異的抗腫瘍能を持つ活性化 TIL が誘導される
ことを示している。さらに彼らは活性化 TIL
の effector 細胞が T リンパ球であり LAK 細胞
とは異なる抗原を認識していると述べている
が、腫瘍抗原の性状については不明であると
している。

人の悪性腫瘍においては悪性黒色腫から誘
導された活性化 TIL が in vitro で自己癌細胞
を特異的に障害するという報告が見られる⁶⁾
- 8), 15)。Itoh ら²⁵⁾は悪性黒色腫、腎癌およ
びその他の肉腫から誘導した活性化 TIL を詳
細に解析し、悪性黒色腫からは自己癌細胞を
特異的に障害する活性化 TIL が誘導され、
effector 細胞は $CD3^+ \cdot CD4^- \cdot CD8^+$ の CTL である
と報告している。さらにその CTL は細胞膜上
の T cell receptor (TCR) - α / β を介し、標的

細胞膜上のMHC抗原を認識することにより自己癌細胞を特異的に障害することを示している。また彼らは、腎癌由来の活性化TILはMHC非拘束性の非特異的細胞障害活性を示し、細胞障害活性はCD16⁺のNK細胞に最も強くCD3⁺・CD16⁻のT細胞サブセットも認められるがその活性は弱く非特異的であると述べている。悪性黒色腫から誘導されるCTLのphenotypeについては、CD3⁺・CD4⁺のサブセットも抗腫瘍活性を発現するという報告も見られる^{7) 26)}。

悪性黒色腫以外の人の悪性腫瘍では自己腫瘍細胞特異的細胞障害活性を持つCTLを誘導し得たとする報告は少ない。Okadaら¹³⁾は婦人科悪性腫瘍由来の活性化TILが自己腫瘍細胞に特異的な高い抗腫瘍活性を示し、そのeffector細胞はCD8⁺のCTLであったと報告し特異的腫瘍抗原が存在するものと推測している。彼らは1,000 U/mlのような高濃度のrIL-2添加培養により誘導される活性化TILはheterogeneousな細胞集団であるため自己腫

瘍細胞特異的細胞障害活性が検出しにくくなると述べ、rIL-2を200 U/mlの条件下で培養することによりCTLを誘導し得たと述べている。一方、Balchら¹⁵⁾は各種の人固形癌120例よりrIL-2 200 U/mlを添加して活性化TILを誘導し解析した結果、自己癌細胞を特異的に障害するCTLが誘導されたのは悪性黒色腫のみであったと報告している。今回の検討中腎癌の数例で低濃度rIL-2により活性化TILを誘導し抗腫瘍活性を計測したが、やはり自己癌細胞特異性は認められなかった。なぜ悪性黒色腫のみでCTLを誘導し得るのかについては明らかではないが、Itohら²⁵⁾は悪性黒色腫は免疫原性が高いものと推定している。

腎癌由来の活性化TILがin vitroで自己および非自己の癌細胞に対して非特異的な高い抗腫瘍活性を示すことは諸家の報告にも見られる通りである^{10) 15) 25)}。そのeffector細胞についてはTILのphenotypeの解析からCD3⁺・CD8⁺のT細胞サブセットであろうと推測

しているものもあるが^{23) 27)}、Itohら²⁵⁾は cell sorting 法により解析した結果、CD3⁻・CD16⁺ の fraction に最も細胞障害活性が強いことを示している。今回の検討では活性化 TIL の細胞障害活性は CD3⁻・CD16⁻・Leu19⁺ の NK 細胞サブセットに最も強いという結果であったが、腎癌由来の活性化 TIL について Leu19 陽性サブセットに着目し effector 細胞を解析した報告は他に見られない。一方、Herberman
ら^{9) 11) 14) 28)}は一連の報告の中で頭頸部扁平上皮癌、原発性および転移性肝癌、卵巣癌から誘導された活性化 TIL は非特異的細胞障害活性を示し、その抗腫瘍活性は Leu19⁺ のサブセットに最も強く、CD3⁺・Leu19⁻ のサブ
セットには細胞障害活性を認めず、Leu19 の陽性率は CD16 の陽性率と相関を認めなかったと述べており、今回の検討により得られた結果と一致している。

腎癌以外の悪性腫瘍から誘導した活性化 TIL の抗腫瘍活性は一般に低値であったが、今

回の検討からはその原因は明らかではない。
この点について Voseら¹⁸⁾ は肺癌および乳癌
から分離した TIL に細胞障害活性が認められ
ない理由として、分離した TIL 中に suppress
5 -ive activity を持つ nylon wool 非不着性細
胞が含まれるためであるとしている。また
Starenら²⁹⁾ は rIL-2 を添加して誘導した大
腸癌由来の活性化 TIL において培養液中に存
在する prostaglandin が LAK 活性の抑制に関
10 与していることを示しており、TIL 培養中に
suppressor cell あるいは suppressive fact-
or が存在し細胞障害活性を抑制しているもの
と推測される。

以上、各種固形癌46例から分離した TIL の
15 性状について解析し、考察を加えて報告した。

自己癌細胞を特異的に障害する CTL を誘導
し癌免疫療法に応用しようとする試みが現在
盛んに行なわれているが、今回の検討では TIL
から CTL を誘導することは困難であるとの
結果であった。しかし、TIL を担癌生体の局

所免疫応答と考えるときその性状を明らかに
することは重要であり、今後さらに詳細な解
析が必要であると考えられる。

結 語

各種固形癌46例より活性化TILを誘導しそ
の性状について種々の検討を加え、以下の結
果を得た。

1. rIL-2 1,000U/mlを添加したAIM VTM培
養液を用いてTILを培養し、46例のうち41
例(89.1%)で活性化TILを誘導し得た。

2. 活性化TILは新鮮分離自己癌細胞に
対し細胞障害活性を有するが、新鮮分離非自
己癌細胞をも障害し、同時に高いNK活性・
LAK活性を示した。特に腎癌由来の活性化
TILはその他の癌由来の活性化TILに比
較していずれの標的細胞に対しても有意に高
い細胞障害活性を示した。しかし、由来臓器
の如何に関わらず活性化TILの細胞障害活

性は非特異的であり、自己癌細胞に対する特異的細胞障害活性は誘導されなかった。

3. 分離直後の T I L は一般に C D 3⁺ の T 細胞が主体であった。r I L-2 の存在下に培養することにより T I L のリンパ球表面マーカーは由来臓器により特徴的変動を示し、腎癌由来の T I L では C D 3 の陽性率が低下し L e u 19 の陽性率が上昇したのに対し、直腸癌由来の T I L では C D 4 の陽性率が有意に上昇した。

4. 活性化 T I L の細胞障害活性は L e u 19 の陽性率と正の相関を示した。また、抗体 + 補体処理による解析においても活性化 T I L の抗腫瘍活性は C D 3⁻・C D 16⁻・L e u 19⁺ の N K 細胞由来のサブセットに最も強く、C D 3⁺ の T 細胞サブセットは関与しないことが示された。

文 献

1) Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.N., et al. : A prognostic report on the treatment of 157 patients with advanced cancer using lymphokine-activated killer cells and interleukin-2 or high dose interleukin-2 alone. N. Engl. J. Med., 316 : 889, 1987.

2) Inokuchi K., Inutsuka S., Frusawa M., et al. : Stromal reaction around tumor and metastasis and prognosis after curative gastrectomy for carcinoma of the stomach. Cancer, 20 : 1924, 1967.

3) Ioachim H.L. : The stromal reaction of tumors: An expression of immune surveillance. J. Natl. Cancer Inst., 57 : 465, 1976.

4) Rosenberg S.A., Speiss P., Lafreniere R. : A New Approach to the Adoptive

Immunotherapy of Cancer with
Tumor-Infiltrating Lymphocytes. Science,
233 : 1318, 1986.

5) Spiess P.J., Yang J.C., Rosenberg S.A
. : In Vivo Antitumor Activity of Tumor-
Infiltrating Lymphocytes Expanded in
Recombinant Interleukin-2. J. Natl. Cancer
Inst., 79 : 1067, 1987.

6) Itoh K., Tilden A.B., Balch C.M. :
Interleukin 2 Activation of Cytotoxic
T-Lymphocytes Infiltrating into Human
Metastatic Melanoma. Cancer Res., 46 :
3011, 1986.

7) Muul L.M., Spiess P.J., Director E.P.
, et al. : IDENTIFICATION OF SPECIFIC
CYTOTOXIC IMMUNE RESPONSES AGAINST
AUTOLOGOUS TUMOR IN HUMAN BEARING
MALIGNANT MELANOMA. J. Immunol., 138 : 989
, 1987.

8) Toplian S.L., Solomon D., Rosenberg

S.A. : TUMOR-SPECIFIC CYTOLYSIS BY
LYMPHOCYTES INFILTRATING HUMAN MELANOMAS
. J.Immunol., 142 : 3714, 1989.

9) Heo D.S., Whiteside T.L., Johnson J.
T., et al. : Long-Term Interleukin 2
-dependent Growth and Cytotoxic Activity
of Tumor-infiltrating Lymphocytes from
Human Squamous Cell Carcinomas of the
Head and Neck. Cancer Res., 47 : 6353,
1987.

10) Belldegrun A., Muul L.M., Rosenberg
S.A. : Interleukin 2 Expanded Tumor
-Infiltrating Lymphocytes in Human Renal
Cell Cancer. Cancer Res., 48 : 206, 1988.

11) Heo D.S., Whiteside T.L., Kanbour A.,
et al. : LYMPHOCYTES INFILTRATING HUMAN
OVARIAN TUMORS I. Role of Leu-19 (NKH1) -
Positive Recombinant IL-2-Activated
Cultures of Lymphocytes Infiltrating
Human Ovarian Tumors. J.Immunol., 140 :

4042, 1988.

12) Yano T., Yasumoto K., Togami M., et al. : PROPERTIES OF RECOMBINANT INTERLEUKIN2-CULTURED TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTES IN HUMAN LUNG CANCER.

Int. J. Cancer, 43 : 619, 1989.

13) Okada Y., Yahata G., Takeuchi S., et al. : A Correlation between the Expression of CD8 Antigen and Specific Cytotoxicity of Tumor-Infiltrating Lymphocytes.

Jpn. J. Cancer Res., 80 : 249, 1989.

14) Takagi S., Chen K., Schwarz R., et al. : Functional and Phenotypic Analysis of Tumor-Infiltrating Lymphocytes Isolated From Human Primary and Metastatic Liver Tumors and Cultured in Recombinant Interleukin-2. Cancer, 63 : 102, 1989.

15) Balch C.M., Reley L.B., Bae Y.M., et al. : Patterns of Human Tumor-Infiltrating Lymphocytes in 120 Human Cancers.

Arch. Surg., 125 : 200, 1990.

16) Hass G.P., Solomon D., Rosenberg S.A.
: Tumor-infiltrating lymphocytes from
nonrenal urological malignancies.

5 Cancer Immunol. Immunother., 30 : 342, 1990.

17) 熊谷勝男, 鈴木隆二, 椎葉健一 : NK
細胞とLAK細胞の活性測定法. 実験医学,
3 : 97, 1985.

18) Vose B.M., Moore M. : SUPPRESSOR CELL
10 ACTIVITY OF LYMPHOCYTES INFILTRATING
HUMAN LUNG AND BREAST TUMORS.

Int. J. Cancer, 24 : 579, 1979.

19) 堀 泰祐, 菅 典道, 山崎信保, et al
.: ヒト固形癌および癌性胸腹水中の腫瘍浸
15 潤リンパ球の抗腫瘍能とそれを用いた癌治療
の試み. 日癌治, 20 : 943, 1985.

20) Topalian S.L., Solomon D., Avis F.P.,
et al. : Immunotherapy of Patients With
Advanced Cancer Using Tumor-Infiltrating
Lymphocytes and Recombinant Interleukin-

2: A Pilot Study. J. Clin. Oncol., 5: 839, 1988.

21) 関根 暉彬, 垣添 忠生, 鷺巢 賢一, et al.
: Tumor-Infiltrating Lymphocytes の培養と
Adoptive Immunotherapy への応用. 癌と化学
療法, 16: 1469, 1989.

22) 八幡 剛木, 岡田 義昭, 本田 修司, et al.
: 腫瘍内浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating
Lymphocyte) を用いた養子免疫療法の基礎と
臨床. 癌と化学療法, 16: 1474, 1989.

23) Molecker J.R., Friddell C.S.,
Sferruzza A., et al.: Activation and
Expansion of Tumor-Derived Activated
Cells for Therapeutic Use.

J. Natl. Cancer Inst., 81: 1655, 1989.

24) 堀 泰祐, 菅 典道, 大垣 和久, et al.
: 腫瘍浸潤リンパ球のTCGF培養による特
異的抗腫瘍能に関する基礎的検討. 日外会誌
, 85: 749, 1984.

25) Itoh K., Platsoucas C.D., Balch C.M.

: AUTOLOGOUS TUMOR-SPECIFIC CYTOTOXIC
LYMPHOCYTES IN THE INFILTRATE OF HUMAN
METASTATIC MELANOMAS. J. Exp. Med., 168 :
1419, 1988.

5 26) Wong J. T., Pinto C. L., Gifford J. D.,
et al. : CHARACTERIZATION OF THE CD4⁺ AND
CD8⁺ TUMOR INFILTRATING LYMPHOCYTES
PROPAGATED WITH BISPECIFIC MONOCLONAL
ANTIBODIES. J. Immunol., 143 : 3404, 1989.

10 27) Schoof D. D., Jung S., Eberlein T. J. :
HUMAN TUMOR-INFILTRATING LYMPHOCYTE (TIL)
CYTOTOXICITY FACILITATED BY ANTI-T-CELL
RECEPTOR ANTIBODY. Int. J. Cancer, 44 :
219, 1989.

15 28) Whiteside T. L., Heo D. S., Takagi S.,
et al. : Cytotoxic antitumor effector
cells in long-term cultures of human
tumor-infiltrating lymphocytes in
recombinant interleukin 2.
Cancer Immunol. Immunother. 26 : 1, 1988.

29) Staren E.D., Economou S.G., Harris J.
E., et al. : Lymphokine-Activated Cell
Induction From Colon Cancer Patients.
Cancer. 64 : 2238, 1989.

5

10

15

表 1

T I L 培養施行例

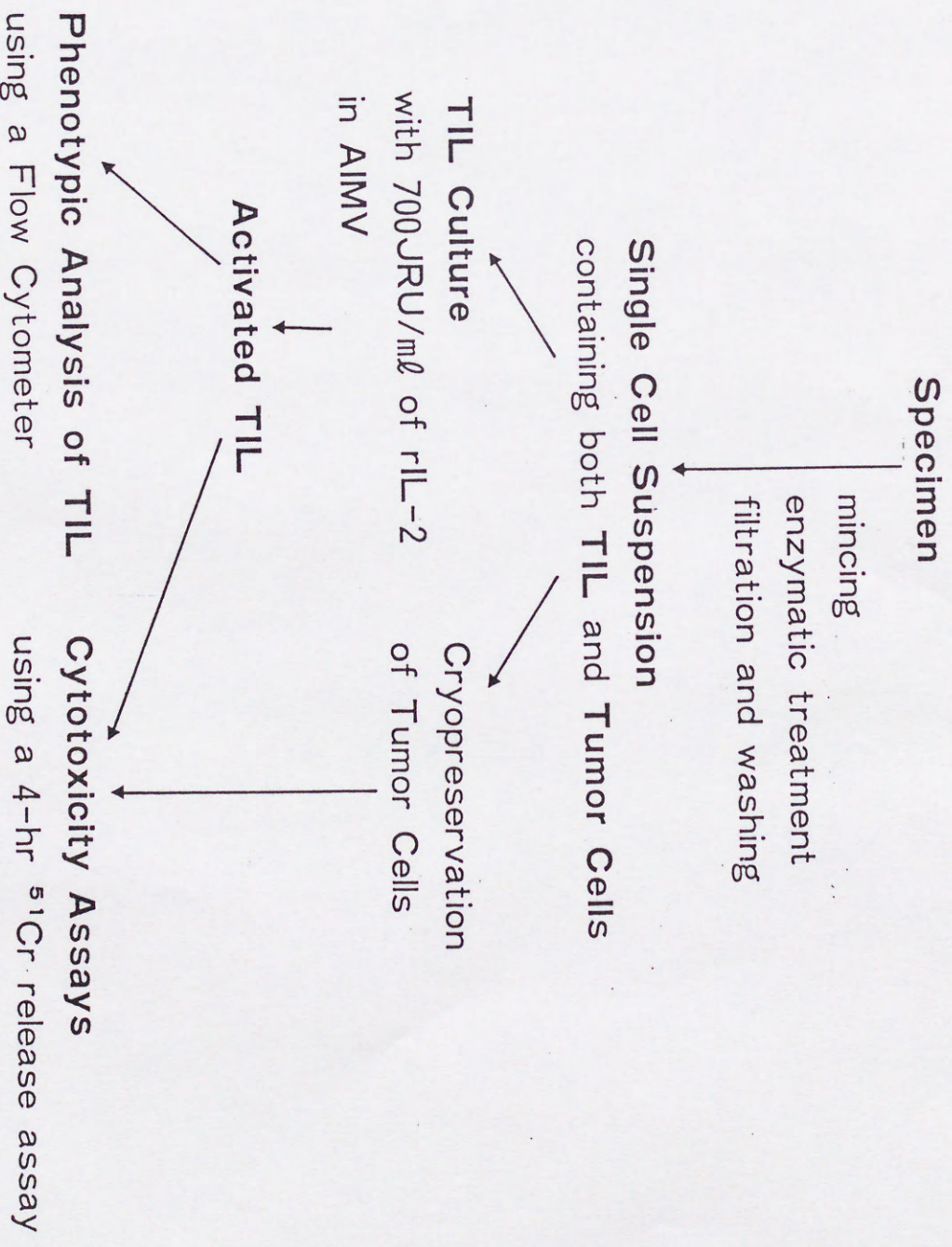
臓器	原発巣	転移巣	計
腎癌	24*	0	24
肝癌	6**	1 (副腎)	7
直腸癌	6	0	6
乳癌	5	0	5
結腸癌	0	1 (肝)	1
食道癌	1	0	1
肺癌	0	1 (副腎)	1
悪性黒色腫	1	0	1
計	43	3	46

組織型は食道癌、悪性黒色腫を除き全例腺癌であつた。*、** 各々培養不能の3例、2例を含む



1

Method of inducing activated TIL



Tumor infiltrating lymphocytes isolated from human solid cancers

Source	Ly ^a recovered (10 ⁻⁶) mean ± SE	TC ^b recovered (10 ⁻⁶) mean ± SE	Ly/TC ratio	Total days in culture
Renal (n=21)	27.7 ± 7.9	28.0 ± 11.4	1.8 ± 0.3	29.6 ± 3.0
Rectum (n=6)	10.3 ± 2.6	14.7 ± 6.4	1.0 ± 0.2	45.3 ± 4.3
Hepatoma (n=5)	79.1 ± 54.4	27.6 ± 17.4	2.1 ± 0.7	39.3 ± 10.3
Breast (n=5)	6.7 ± 3.4	7.3 ± 2.4	1.0 ± 0.3	32.2 ± 4.5
Colon (n=1)	0.6	1.7	0.35	52
Esophagus (n=1)	1.6	3.5	0.46	35
Lung (n=1)	37.0	43.0	0.35	22
Melanoma (n=1)	2.0	6.0	0.33	52

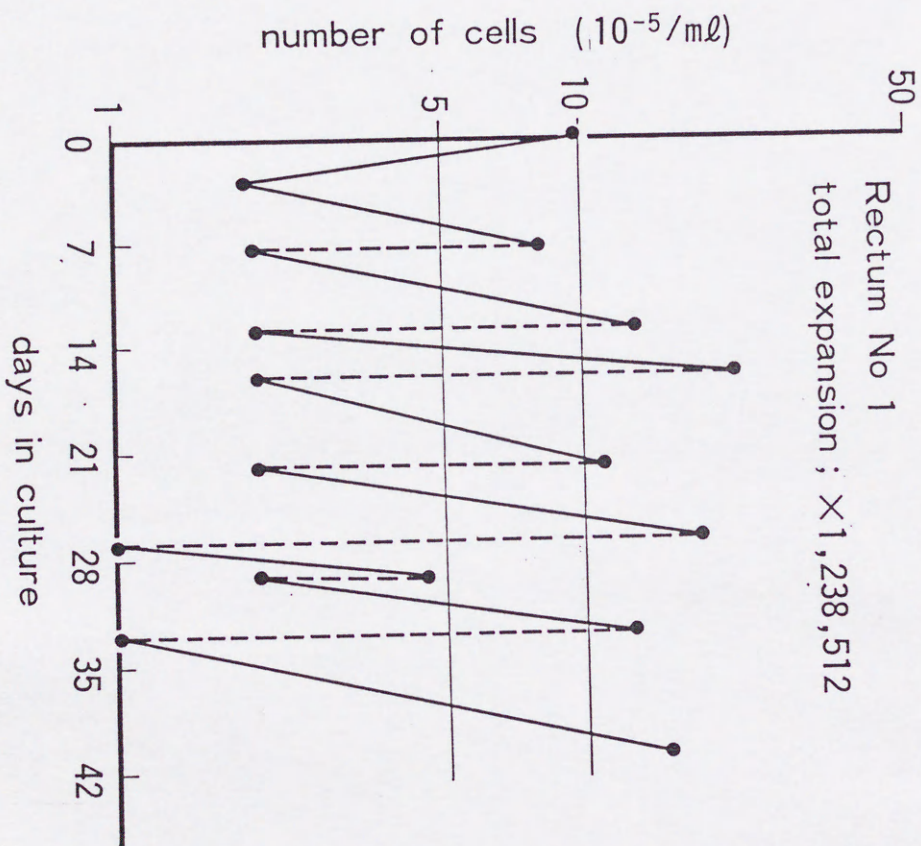
^a Ly; lymphocytes ^b TC; tumor cells



2

Growth pattern of rIL-2-expanded TIL ; two representative cases

a



b

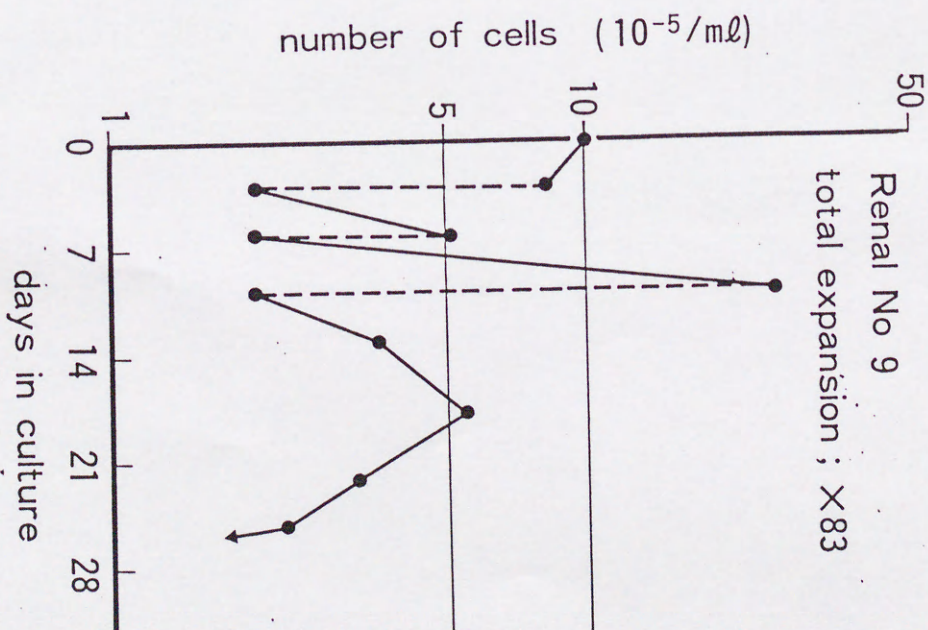


表 3

Cytotoxic activity of rIL-2 activated TIL derived from human solid cancers

Source	% specific lysis against following targets (E/T=20)			
	auto TC ^a (n)	allo TC ^b (n)	K 562 (n)	W 1 S H (n)
Renal	25.8±4.30(16)	19.9±3.85(18)	70.6±3.20(20)	52.5±4.79(19)
Rectum	8.0±4.21(5)	6.4±2.86(4)	26.1±10.70(6)	15.3±6.46(6)
Hepatoma	10.1±3.62(4)	1.8±2.89(3)	50.9±12.80(5)	27.6±10.60(6)
Breast	10.1±3.47(3)	6.1 (1)	73.2±7.61(5)	26.8±8.80(5)
Colon	-0.1 (1)	ND ^c	6.8	2.5
Esophagus	17.5 (1)	ND ^c	2.0	-0.3
Lung	38.1 (1)	ND ^c	84.7	54.1
Melanoma	0 (1)	ND ^c	0	0

^a auto TC ; autologous tumor cells ^b allo TC ; allogeneic tumor cells
^c ND ; not determined

表 4

A comparison of cytotoxicity against autologous and allogeneic tumor cells by rIL-2 activated TIL

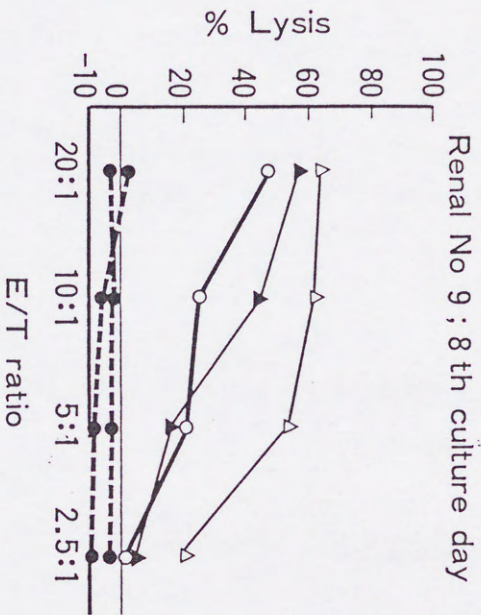
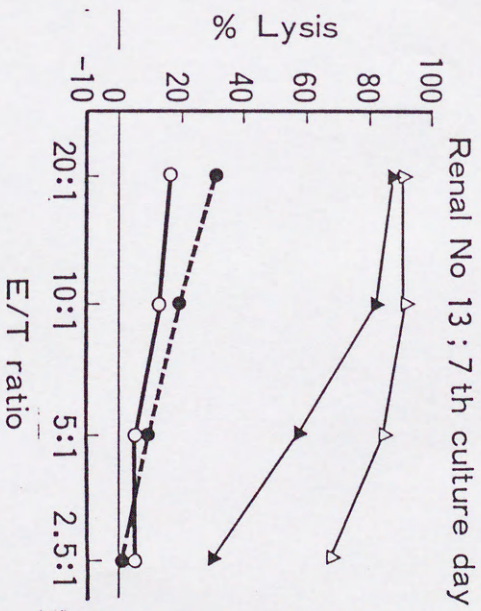
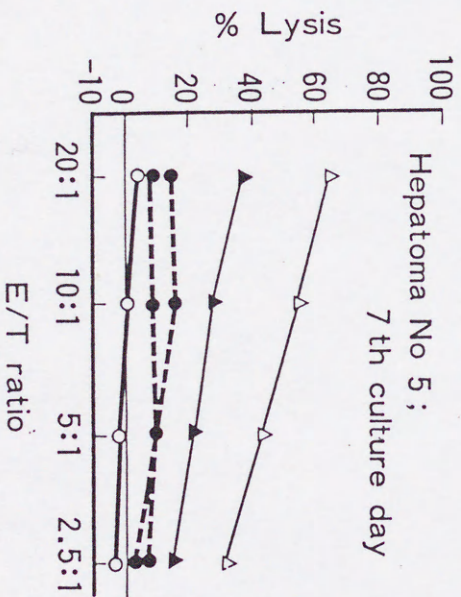
TIL from	% lysis against following targets (E/T=20)					days in culture
	autoTC ^a	alloTC ^b -a	alloTC ^b -b	alloTC ^b -c	K562 WISH	
Renal- 5	64.4	55.1	17.2	14.0	83.0 77.6	10
Renal- 6	35.1	17.0	14.8	9.9	73.1 77.2	12
Renal- 7	42.3	20.9	7.6	—	70.3 70.5	17
Renal- 9	45.3	1.6	-2.6	—	63.7 56.7	8
Renal-10	8.2	8.4	5.2	—	75.8 55.6	21
Renal-12	2.5	27.9	—	—	85.0 40.2	8
Renal-13	23.6	24.8	—	—	75.3 77.2	13
Renal-14	16.0	1.7	—	—	66.4 61.0	7
Renal-15	17.0	5.7	—	—	65.9 67.2	9
Renal-16	14.9	3.7	—	—	70.4 47.3	9
Renal-18	-0.2	1.5	—	—	21.0 2.6	7
Renal-19	12.7	17.0	—	—	74.7 26.3	40
Renal-20	22.2	47.0	—	—	79.1 75.3	17
Renal-21	23.2	35.7	—	—	48.7 20.8	19
Renal-22	35.2	37.0	—	—	80.5 50.7	12
Renal-24	43.3	25.7	—	—	80.0 —	8
Rectum-2	3.2	13.7	-4.9	—	37.7 35.3	9
Rectum-5	-2.7	0	—	—	7.4 1.5	26
Rectum-6	2.9	4.6	—	—	53.2 33.8	14
Hepatoma-2	11.1	1.0	-4.9	—	89.2 62.6	15
Hepatoma-5	0.2	-2.7	-5.0	—	65.3 31.2	19
Hepatoma-7	11.4	7.2	—	—	22.7 4.4	25

^a autoTC; autologous tumor cells

^b alloTC; allogeneic tumor cells(a, b, c indicate tumor cells from different patient)



Target specificity of rIL-2 activated TIL

a**b****c**

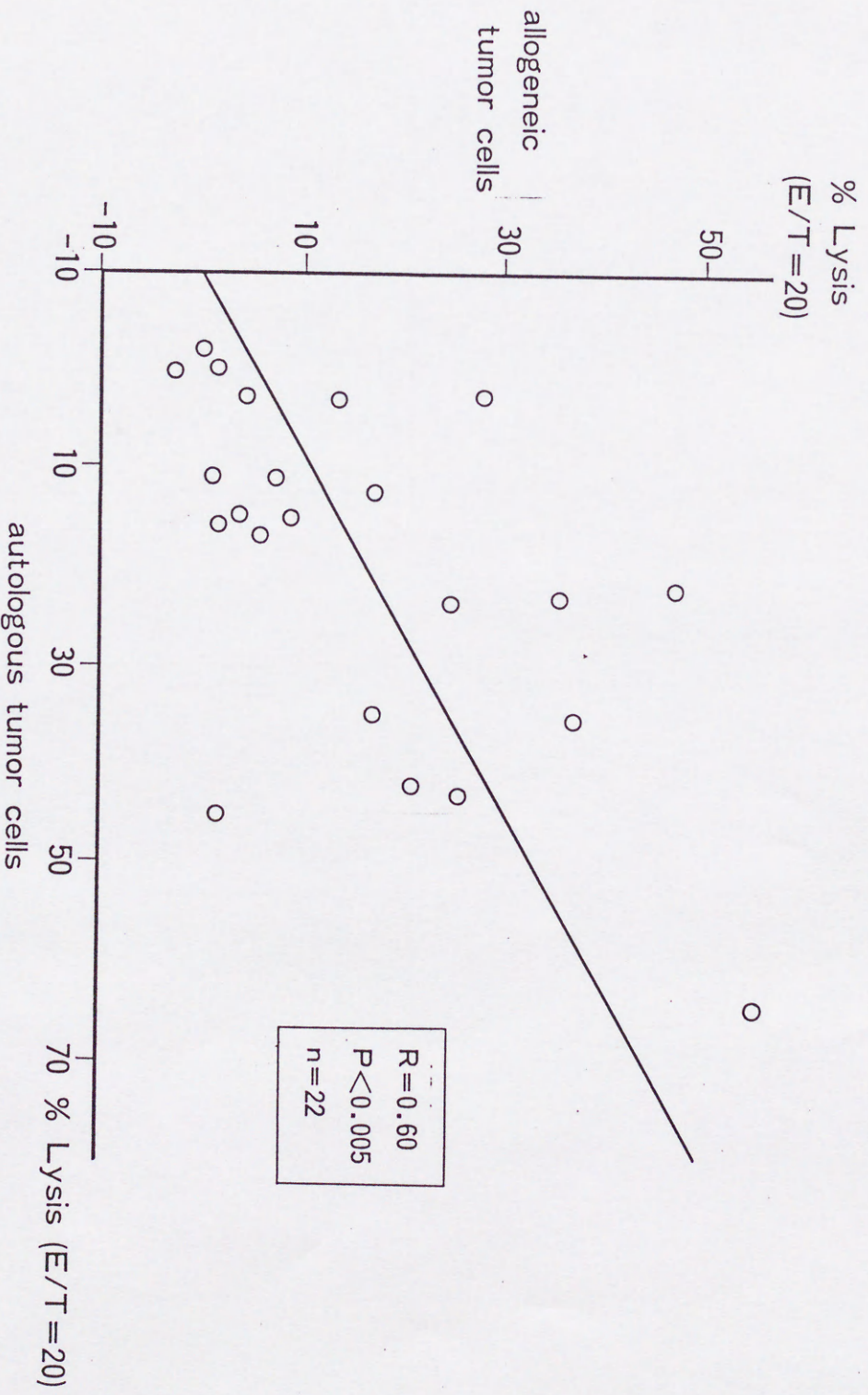
target cells

- △ K562
- ▲ WISH
- fresh autologous
- fresh allogeneic



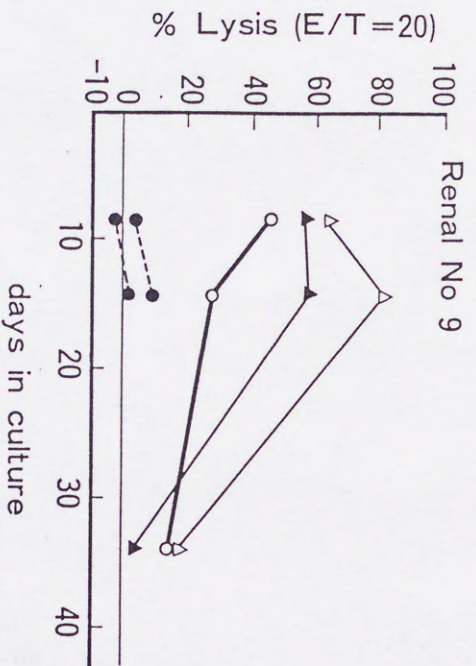
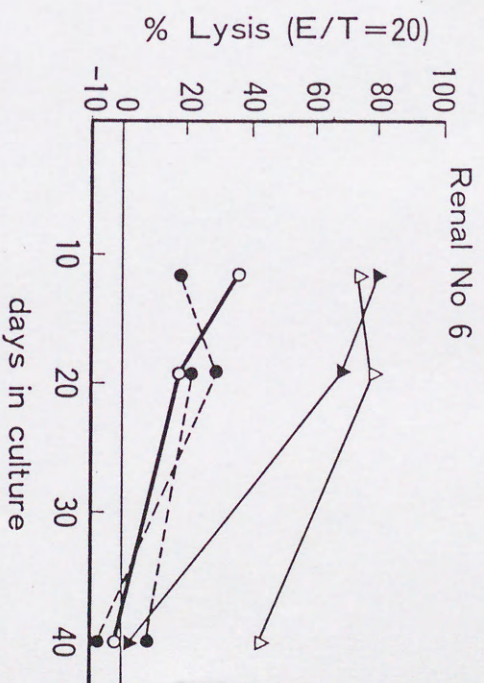
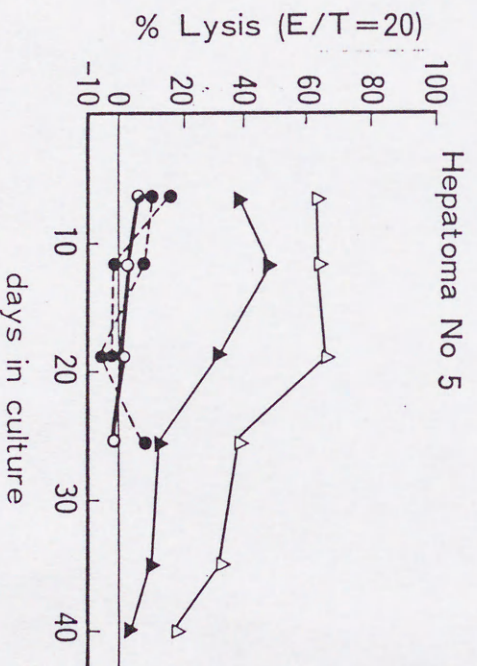
4

Cytotoxic activity of rIL-2 activated TIL against autologous and allogeneic tumor cells





Kinetic changes in cytotoxic activity of rIL-2 activated TIL

a**b****c**

target cells

- △ K562
- ▲ WISH
- fresh autologous
- fresh allogeneic

表 5

Kinetic changes in cell surface antigen expression of rIL-2 activated TIL

Source	cell surface antigen expression (mean±SE %)						
	C D 3	C D 4	C D 8	Leu 11	Leu 19	IL-2R ^a	HLA-DR
Renal F ^b	68.0±13.9	30.2±11.8	33.3±16.0	8.7±5.5	14.1±7.8	3.0±2.8	45.5±15.0
(n=10) C ^c	56.0±5.8	13.6±3.2	40.2±5.9	5.3±1.5	34.6±5.3	11.4±5.3	70.5±15.9
Rectum F ^b	50.1±7.2	19.8±7.5	14.8±1.8	2.3±3.6	10.8±3.6	3.7±1.7	47.4±9.1
(n=3) C ^c	97.2±0.6	85.5±5.5	10.6±5.0	5.0±2.5	12.6±3.8	56.6±14.8	95.9±2.6
HCC ^d F ^b	74.3±6.4	41.2±7.6	27.4±3.0	9.5±3.9	12.1±1.4	4.4±1.3	50.0±5.4
(n=3) C ^c	75.1±7.7	55.7±14.5	22.1±1.2	4.7±1.2	19.1±7.4	41.6±14.3	74.0±10.7
Breast F ^b	74.9±2.3	33.5±6.1	30.1±3.8	18.3±17.1	17.7±12.3	4.5±0.3	62.4±5.3
(n=3) C ^c	58.7±10.4	21.1±12.7	32.0±9.4	1.6±0.6	22.4±4.9	10.0±2.2	75.6±5.1

^a IL-2R; IL-2 receptor ^b F; fresh TIL ^c C; cultured TIL ^d HCC; hepatoma

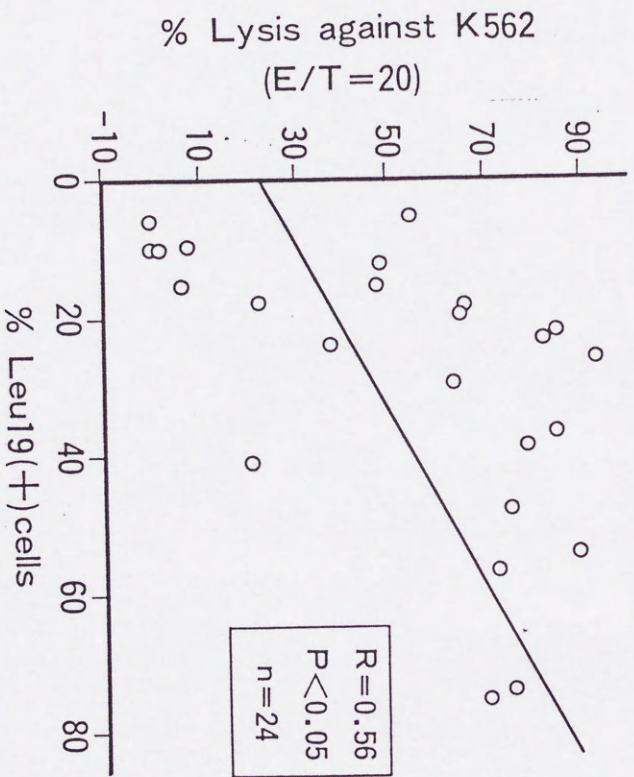
* ; P<0.05 * ; P<0.005



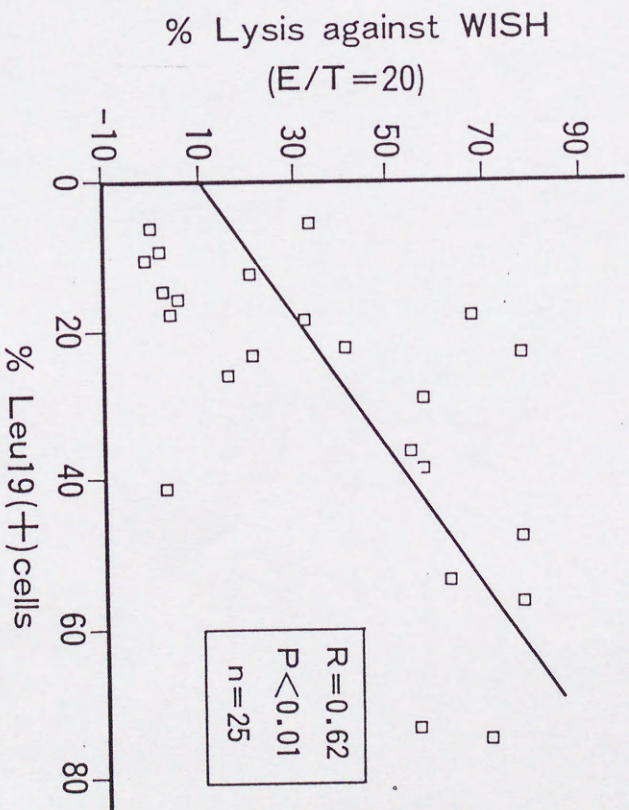
6

Correlation between cytotoxicity of rIL-2 activated TIL and the percentage of Leu19(+) cells

a



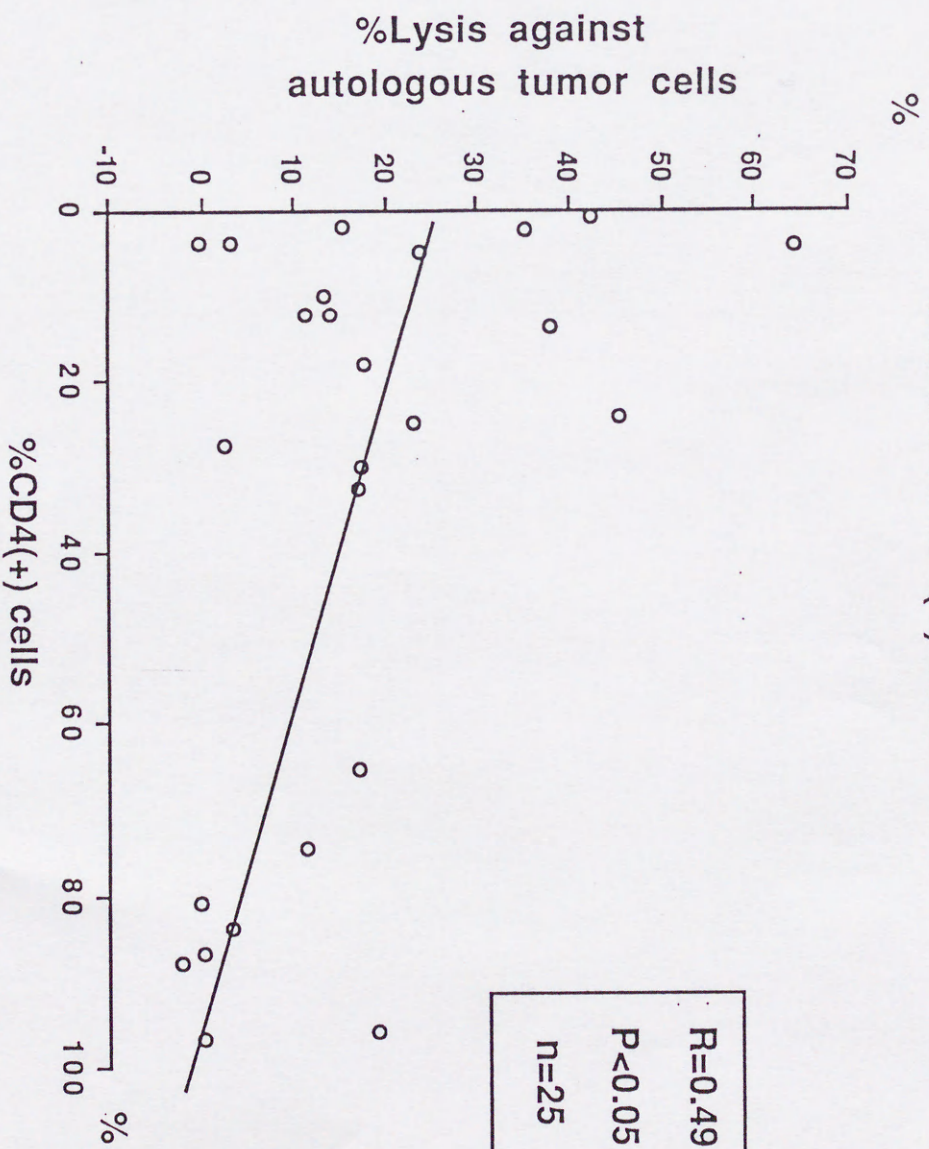
b





7

Correlation between cytotoxicity of rIL-2 activated TIL and the %CD4(+) cells





Phenotypic analysis of anti-tumor effector cells in rIL-2 activated TIL derived from RCC No 23

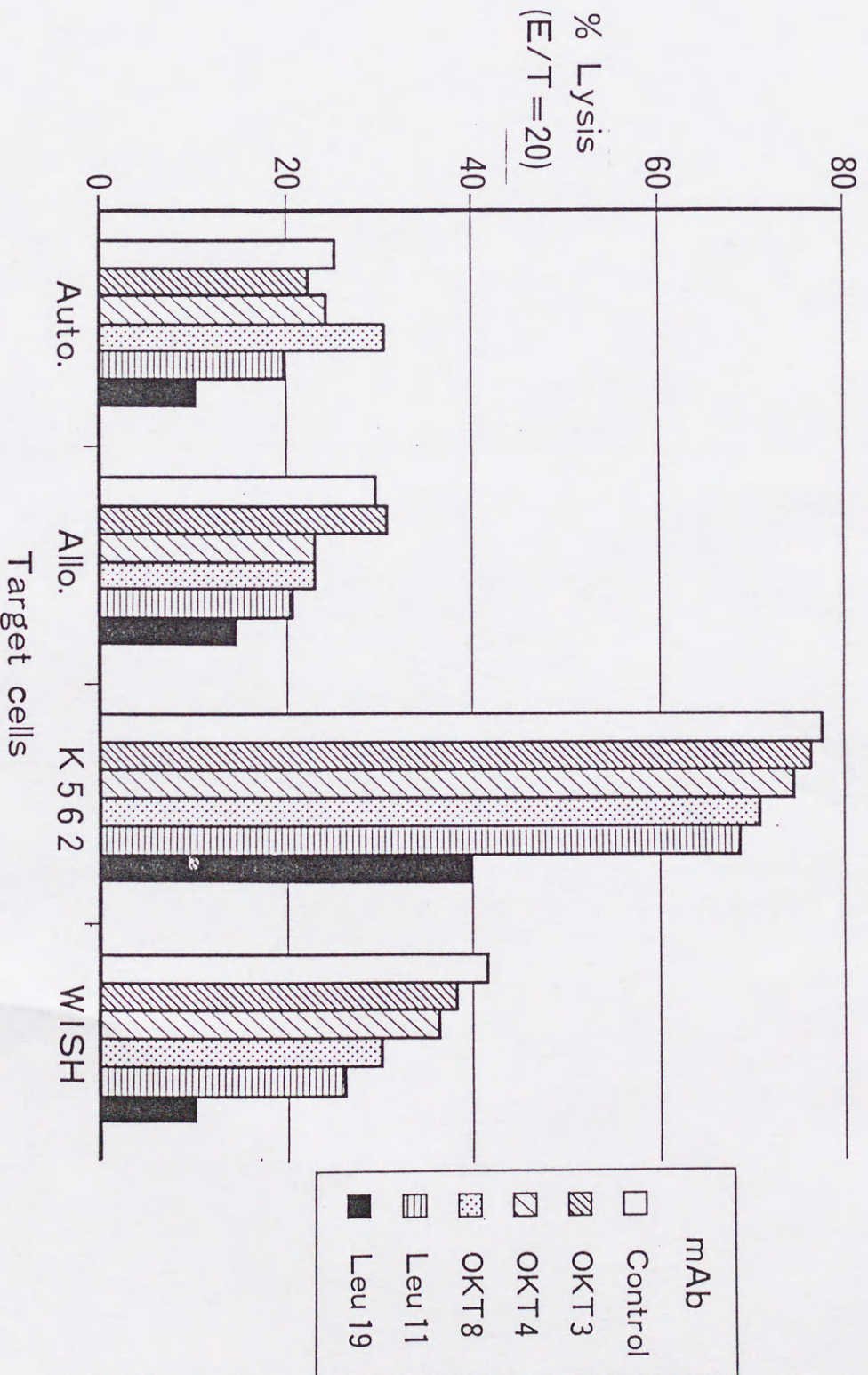


表 6

Phenotypic analysis of anti-tumor effector cells*
in rIL-2 activated TIL[※]

monoclonal Ab	% lysis against following targets (E/T=20)			
	auto TC ^a	allo TC ^b	K 562	W 1 SH
C ^c alone	25.4	29.7	77.9	41.9
OKT 3 + C ^c	22.3(10.6)	31.0(—)	76.6(1.7)	38.2(8.8)
OKT 4 + C ^c	24.2(4.7)	23.0(22.6)	74.7(4.1)	36.3(13.4)
OKT 8 + C ^c	30.7(—)	23.0(22.6)	71.1(8.7)	30.2(27.9)
Leu 11 + C ^c	19.6(22.8)	20.7(30.3)	68.9(11.6)	25.9(38.2)
Leu 19 + C ^c	10.6(58.3)	14.6(50.8)	39.8(48.9)	10.1(75.9)

* Cytotoxicity assays performed with the effector cells obtained by depletion of selected cell types using direct complement-dependent cytotoxicity with monoclonal antibodies.

※ TIL derived from renal cell cancer No 23 on 13th culture day

^a auto TC ; autologous tumor cells ^b allo TC ; allogeneic tumor cells

^c C ; complement

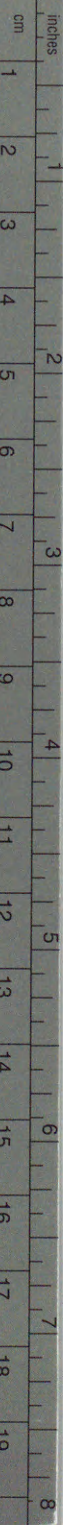
Figures in each parenthesis indicate % inhibition of the cytotoxicity.

表 7

Cell surface antigen expression of rIL-2
activated TIL derived from renal cell
cancer No 23 on 13 th culture day

Leu 4 (+)	Leu 19 (+)	4.3%	Leu 11 (+)	Leu 19 (+)	11.7%
Leu 4 (+)	Leu 19 (-)	27.4%	Leu 11 (+)	Leu 19 (-)	2.3%
Leu 4 (-)	Leu 19 (+)	64.5%	Leu 11 (-)	Leu 19 (+)	55.7%
Leu 4 (-)	Leu 19 (-)	3.8%	Leu 11 (-)	Leu 19 (-)	30.3%





Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak

Blue	Cyan	Green	Yellow	Red	Magenta	White	3/Color	Black

Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

